

進行性偽性リウマチ様異形成の原因遺伝子である WISP3 の 役割解明に向けた動物モデルアプローチ

中村幸男¹⁾²⁾³⁾・脇谷滋之⁴⁾・田原秀晃²⁾
加藤博之³⁾・Matthew L. Warman⁵⁾

1) 国立病院機構村山医療センター臨床研究センター

2) 東京大学医科学研究所臓器細胞工学分野

3) 信州大学医学部整形外科

4) 大阪市立大学医学部整形外科

5) ハワードヒューズ医学研究所, ハーバード大学附属ボストン小児病院整形外科
およびハーバード大学医学部遺伝子解析部門

要旨 常染色体劣性関節性疾患である Progressive Pseudorheumatoid Dysplasia (進行性偽性リウマチ様異形成: PPD) は 20 歳に至るまでに関節破壊を生じ人工関節置換術を必要とするため, その病態解明は急務である。これまでに PPD の原因遺伝子として WISP3 が同定されたが, WISP3 遺伝子欠損マウスが PPD の表現型を示さないことから, その分子メカニズムは不明であった。今回我々は, WISP3 がゼブラフィッシュの軟骨形成に重要であること, および骨軟骨形成において重要な役割を果たす BMP および Wnt シグナル伝達系を WISP3 が制御することを明らかにした。また, PPD 患者に生じている WISP3 の遺伝子変異 (遺伝子欠失) が WISP3 の機能欠損もしくは低下をもたらすことを示した。以上より PPD における関節障害は, WISP3 を介した BMP および Wnt シグナル伝達系の異常により引き起こされると考えられる。

序文

ヒト遺伝学的手法により, progressive pseudo-rheumatoid dysplasia (進行性偽性リウマチ様異形成: 以下, PPD) と WISP3 遺伝子変異の関連性が明らかにされたが²⁾, WISP3 遺伝子欠損マウスは PPD の病態を示さないため⁴⁾, WISP3 遺伝子の分子メカニズム, 特に生体内における役割は不明であった。そのため今回我々は, 発生生物学研究において有用な脊椎動物であるゼブラフィッシュを用いて WISP3 の分子生物学的機能につい

て検討した。

方法および結果

1. WISP3 遺伝子ノックダウンゼブラフィッシュにおける軟骨障害

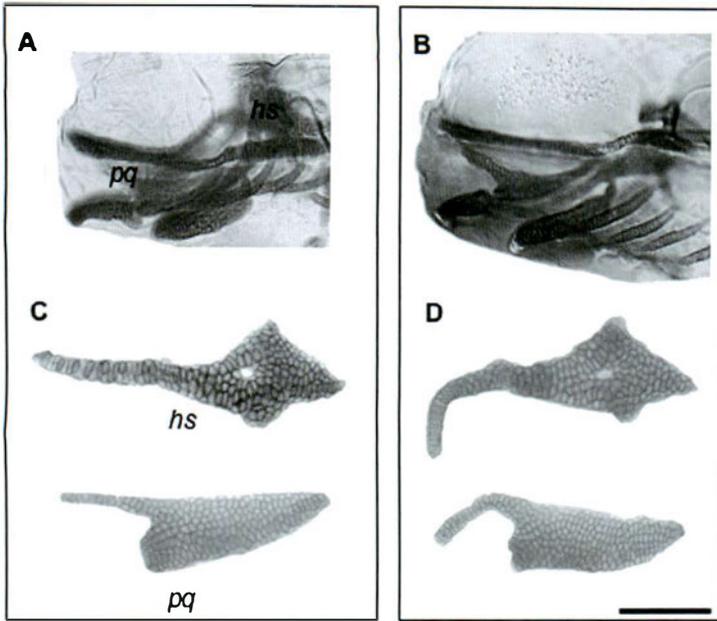
DNA オリゴをゼブラフィッシュの卵に注射することにより, WISP3 遺伝子発現をノックダウンしたところ, 脆弱で形態異常を伴う軟骨が観察された (図 1)。以上より, WISP3 が軟骨のマトリックス産生, 軟骨形成に重要な役割を果たしている可能性が示唆された⁵⁾。

Key words : WISP3, progressive pseudorheumatoid dysplasia (進行性偽性リウマチ様異形成), joint destruction (関節破壊), BMP/Wnt signal (BMP/Wnt シグナル), Zebrafish (ゼブラフィッシュ)

連絡先 : 〒 208-0011 東京都武蔵村山市学園 2-37-1 村山医療センター臨床研究センター 中村幸男 電話(042)561-1221
受付日 : 平成 21 年 12 月 10 日

野生型

WISP3遺伝子ノックダウン



100ミクロン

図 1.

生後5日のゼブラフィッシュ
野生型(A, C)と WISP3 遺伝子ノックダウンゼ
ブラフィッシュ(B, D)のアルシアンブルー染
色後の比較

全体側面像では両者に大きな変化を認めなかつ
たものの(A, B), WISP3 遺伝子ノックダウン
ゼブラフィッシュの軟骨は形態の異常および脆
弱性を認めた(D).

hs : hyosymplectic 軟骨

pq : palatoquadrate 軟骨

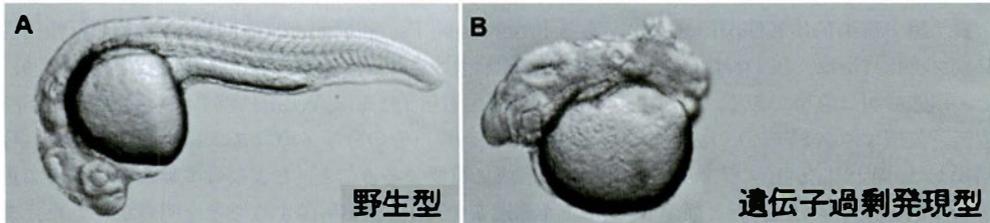


図 2. 生後1日のゼブラフィッシュ

野生型(A)と WISP3 遺伝子過剰発現ゼブラフィッシュ(B)の比較. WISP3 遺伝子を過剰発
現すると背側化促進現象を認めた(B).

2. 遺伝子過剰発現ゼブラフィッシュにおける WISP3 の BMP シグナル伝達系および Wnt シグナル伝達系の阻害作用

データベースを検索し, ヒト, マウス, ゼブラ
フィッシュ間で DNA 配列およびアミノ酸配列を
比較した所, WISP3 遺伝子は進化上高度に保存
されていることを確認した⁵⁾. ゼブラフィッシュ
の全長 WISP3 遺伝子をクローニングし過剰発現
した結果, 背側化促進が観察された(図2). これは BMP (bone morphogenetic protein : 骨形成タン
パク質)シグナルが低下した時の表現型に似て
おり³⁾, WISP3 が BMP シグナルを阻害している
可能性が考えられた. そこで WISP3 と BMP を
共発現したところ, BMP 過剰発現による腹側化
促進作用を WISP3 は抑制した³⁾⁵⁾. 以上より,

WISP3 は BMP シグナルの阻害因子であること
が示唆された⁵⁾. 興味深いことに, PPD 患者に生
じている遺伝子変異を導入した WISP3 は野生型
に比べ BMP シグナルの抑制が弱く, WISP3 を介
した BMP シグナルの変化が PPD の病態に関与
している可能性が考えられた⁵⁾. 次に, BMP と同
様に骨軟骨形成に関わる Wnt シグナル伝達系と
WISP3 遺伝子の関係を調べるため, WISP3 と
Wnt リガンドである Wnt8 との共発現実験を
行った. WISP3 の共発現により, Wnt8 過剰発現
に伴う頭眼部形成不全がほぼ正常に回復したこ
とから(図3), WISP3 は Wnt シグナルも抑制して
いる可能性が示唆された. また, 上述の WISP3
遺伝子変異体は野生型に比べ Wnt シグナルの阻
害活性が低かった⁵⁾. このことから WISP3 は

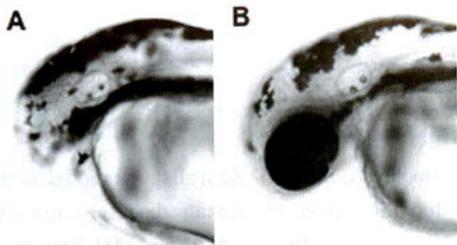


図 3. 生後1日のゼブラフィッシュ Wnt8を過剰発現すると頭眼部形成不全が起こるが(A), WISP3遺伝子の共発現により頭眼部はほぼ正常に回復した(B).

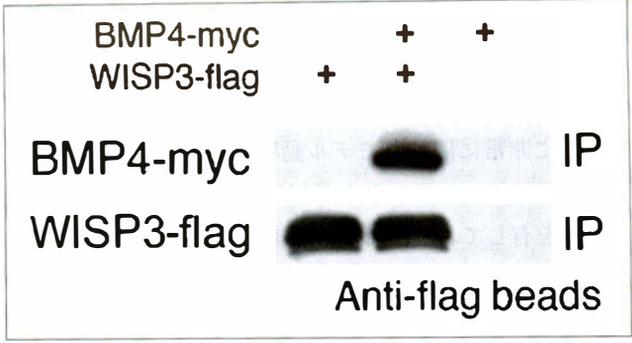


図 4. WISP3 と BMP4 の免疫沈降法
BMP4 と WISP3 は複合体を形成することが確認できた。

図 5. ▶

WISP3 と LRP6, FzD8, Wnt1 の免疫沈降実験の結果

WISP3 は FzD8, LRP6 と結合するが(A, B), Wnt1 と結合しなかった(C). WISP3 は量依存的に Wnt/FzD8/LRP6 複合体形成を阻害した(A, B, C).

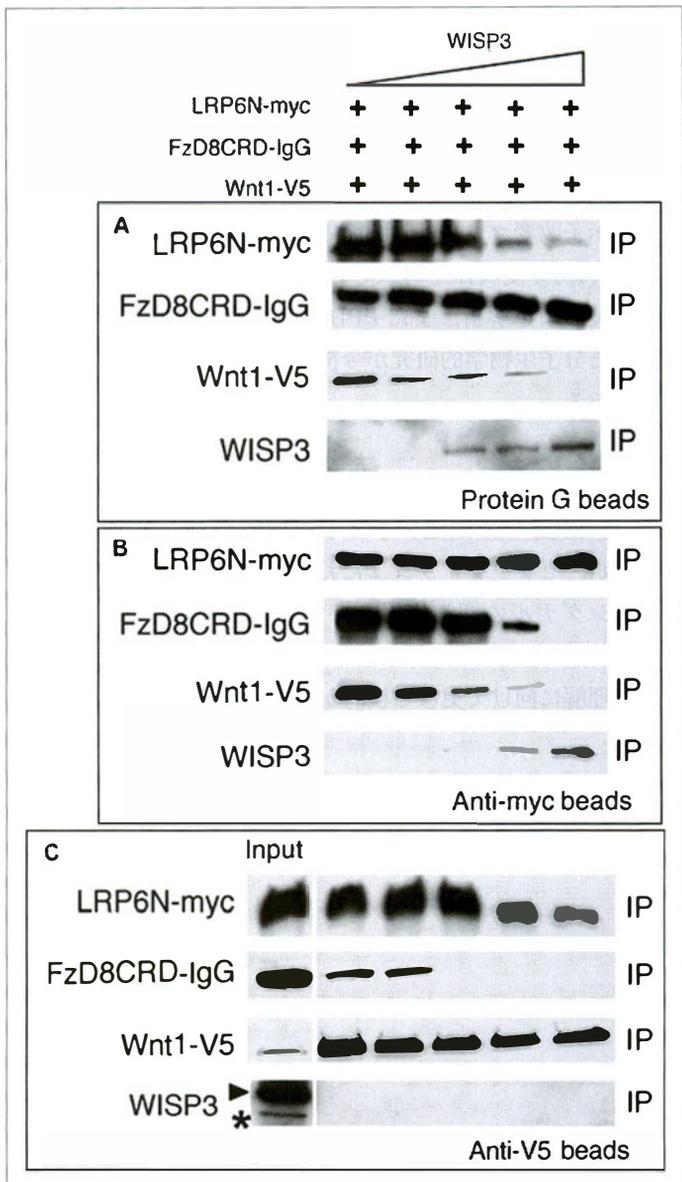
BMP シグナルだけでなく Wnt シグナルも制御し, WISP3 遺伝子の変異による BMP/Wnt 阻害活性の低下が PPD の病態に関与することがわかった.

3. WISP3 は BMP シグナルをリガンドレベルで制御し, Wnt シグナルをレセプターレベルで制御する

上記で得た知見をもとに, 細胞株を用いて免疫沈降法を行い WISP3 遺伝子の機能を検討した. その結果, WISP3 が BMP と複合体を形成することを見出した(図 4). また WISP3 は Wnt レセプターである LRP6 と Frizzled (FzD) と相互作用すること, 量依存的に Wnt/FzD/LRP6 複合体形成を阻害すること(図 5)が明らかになった. これらの結果より, WISP3 は BMP シグナルはリガンドレベルで, Wnt シグナルはレセプターレベルで阻害因子として機能していると考えられる.

考 察

小型硬骨魚類であるゼブラフィッシュは体長 3~4 cm の淡水の熱帯魚であり, 横縞模様が特徴的で飼育が容易, 多産, 短い発生期間などの利点のため, 生物個体レベルでの研究



に非常に優れたモデル動物である⁷⁾。またゼブラフィッシュはヒトと類似した遺伝子、器官、組織を有しており、ヒトの組織形成、疾患モデル動物としてもその有用性が期待されている¹⁾。今回ゼブラフィッシュを用いた研究で、PPDの原因遺伝子として同定された WISP3 が、骨軟骨の発生、維持に重要である BMP および Wnt シグナルの抑制作用を持つことを明らかにした。

また、PPD 患者に見出される変異を持った WISP3 は BMP, Wnt シグナルの抑制活性が低下しており、PPD の関節病態に BMP および Wnt シグナルの亢進が関与している可能性が示唆された。予想外なことに、我々が作製した WISP3 遺伝子改変マウスは骨関節の表現型を示さない⁴⁾⁶⁾。WISP3 変異体を導入したノックインマウスの作製および解析、また PPD 患者由来の細胞を用いた分子生物学的研究が今後の研究の発展に必要である。

結 語

PPD の原因遺伝子として同定された WISP3 が、ゼブラフィッシュにおいて BMP および Wnt シグナルの抑制作用を持つことを報告した。今後、WISP3 遺伝子の骨関節における詳細な機能理解に向けて更なる検討が必要である。

文 献

- 1) Dooley K, Zon LI : Zebrafish : a model system for the study of human disease. *Curr Opin Genet Dev* 10 (3) : 252-256, 2000. Review.
- 2) Hurvitz JR, Suwairi WM, Van Hul W, et al : Mutations in the CCN gene family member WISP3 cause progressive pseudorheumatoid dysplasia. *Nat Genet* 23 : 94-98, 1999.
- 3) Kishimoto Y, Lee KH, Zon L, et al : The molecular nature of zebrafish swirl : BMP2 function is essential during early dorsoventral patterning. *Development* 124 : 4457-4466, 1997.
- 4) Kutz WE, Gong Y, Warman ML : WISP3, the gene responsible for the human skeletal disease progressive pseudorheumatoid dysplasia, is not essential for skeletal function in mice. *Mol Cell Biol* 25 : 414-421, 2005.
- 5) Nakamura Y, Weidinger G, Liang JO, et al : The CCN family member Wisp3, mutant in progressive pseudorheumatoid dysplasia, modulates BMP and Wnt signaling. *J Clin Invest* 117 : 3075-3086, 2007.
- 6) Nakamura Y, Cui Y, Fernando C, et al : Normal growth and development in mice over-expressing the CCN family member WISP3. *J Cell Commun Signal* 3 : 105-113, 2009.
- 7) 中村幸男 : 整形トピックス ゼブラフィッシュと整形外科分野. *整形外科* 61 (5) : 454, 2010.

Abstract

Model Organism Approaches for understanding the Role of the WISP3 gene that Mutates in Progressive Pseudorheumatoid Dysplasia

Yukio Nakamura, M. D., et al.

Clinical Research Center, National Hospital Organization, Murayama Medical Center

Loss-of-function mutations in the gene encoding Wnt1-inducible signaling pathway protein 3 (WISP3) cause the human autosomal recessive skeletal disorder Progressive Pseudorheumatoid Dysplasia (PPD)²⁾. PPD leads to joint failure by 20 years of age and requires joint replacement surgeries. Therefore, understanding the patho-physiology in PPD is paramount to developing effective treatment. In mice, neither WISP3 deficiency or WISP3 over-expression caused overt phenotype⁴⁾⁶⁾. Consequently, the *in vivo* activities of WISP3 have remained elusive. We investigated the biologic activity of WISP3 *in vivo* using loss-of-function and gain-of-function approaches. Inhibition of WISP3 protein expression in developing zebrafish affected pharyngeal cartilage shape. Over-expression of WISP3 protein inhibited BMP and Wnt signaling in developing zebrafish. Conditioned medium containing WISP3 also inhibited BMP and Wnt signaling in mammalian cells by binding to BMP ligand and to the Wnt co-receptors LRP and Frizzled, respectively. WISP3 proteins containing disease-causing amino acid substitutions found in patients with PPD reduced activity in these assays⁵⁾. These data provide a biologic assay for WISP3 during zebrafish cartilage development, and suggests that dysregulation of BMP and/or Wnt signaling contributes to joint failure in humans with PPD.